

发育期单眼形觉剥夺弱视模型猫视皮层 谷氨酸受体状况的研究*

刘 峰, 侯 川, 陈曼玲, 马 麟[△]

四川大学华西医院 眼科(成都 610041)

【摘要】 目的 观察单眼形觉剥夺性弱视动物模型谷氨酸受体(GluRs)的变化,探索形觉剥夺性弱视发生的物质基础。方法 11只初生家养猫随机分为两组,处理组在3周龄时缝合单侧眼睑塑造单眼形觉剥夺性弱视模型,3月后用受体的放射性配体结合分析实验观测视皮层 GluRs 的结合位点数和亲和力。对照组未予特殊处理。结果 处理组视皮层 GluRs 结合位点数较对照组下降($P < 0.001$),而KD值高于对照组($P < 0.001$)。两组放射性配体-受体结合实验的 Hill 系数均接近于1。L-[3,4-³H]-谷氨酸与各型 GluRs 结合位点的亲和力相同,无正负协同效应。结论 单眼形觉剥夺性弱视动物模型视皮层 GluRs 亲和力低, GluRs 参数出现异常,说明形觉剥夺性弱视的发生可能有一定的物质基础。

【关键词】 单眼形觉剥夺 视觉发育 弱视 谷氨酸 视皮层

【中图分类号】 R777.44

Effects of Monocular Visual Deprivation on Parameters of GLuRs in Visual Cortex in Developing Kittens LIU Zheng, HOU Chuan, CHEN Man-ling, Ma Lin[△]. Department of Ophthalmology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: mazouoph@mail.sc.cninfo.net

【Abstract】 Objective To explore the molecular mechanism of the development of amblyopia. Methods Lid suture was performed on 5 kittens at 3 weeks of age to produce monocular visual deprivation. Six kittens were used as controls without any treatment. Three months later, the characteristics of [3,4-³H]l-glutamate binding to the visual cortical membranes of the kittens were studied using radiolabelled ligand receptor binding assay. Results The kittens with monocular deprivation had decreased GluRs binding sites in the visual cortex as compared with the controls ($P < 0.001$). The kittens with monocular deprivation had greater value of KD than the controls ($P < 0.001$), indicating a decrease in the affinity of GluRs. The Hill coefficients of all of the kittens were close to 1, indicating that [3,4-³H]l-glutamate binded to a single-site receptor, obeying mass action law. Even if there were multi binding sites in GluRs, the affinity of these sites to [3,4-³H]l-glutamate was almost identical. Neither positive nor negative interactive effects existed. Conclusion Monocular deprivation does affect the binding parameters (KD and B_{max}) of GluRs, which may be a molecular mechanism of the development of amblyopia.

【Key words】 Monocular visual deprivation Visual development Amblyopia Glutamates Visual cortex

弱视是我国儿童的常见病和多发病,其发病率约2.8%^[1]。就理论上而言,弱视既然是一种视功能的异常状态,那么必然有其发生的物质基础。近年来,人们利用应用药理学、免疫细胞化学以及分子生物学技术从神经递质、受体以及神经元代谢的神经生物化学角度来探索弱视发病机制。在这一研究领域中普遍受到关注的是中枢神经系统常见的一种兴奋性神经递质——谷氨酸(Glu)及其受体(GluRs)。本研究利用在猫视觉发育敏感期内缝合其单侧眼睑的方

法,塑造出单眼形觉剥夺性弱视动物模型,以受体的放射性配体结合,分析观测视皮层 GluRs 的结合位点数和亲和力等特征参数,以初步探讨弱视发生的物质基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

11只初生家养猫仔,雌雄不限,由四川大学实验动物中心提供。随机分为两组,对照组6只,处理组5只。3周龄时,在局麻下行单侧眼睑缝合术封闭处理组幼猫右眼^[2]。对照组未予特殊处理。

* 国家自然科学基金(批准号 39370725)资助

[△] 通讯作者, E-mail: mazouoph@mail.sc.cninfo.net

1.2 仪器、药品和试剂

玻璃匀浆器(30 mL, 宁波新芝科器厂), Beckman L8-80 型高速和超高速冷冻离心机(美国 Beckman), FJ-2107P 型液体闪烁计数仪(西安二六二厂), SZX-B 水浴振荡器(哈尔滨东方电控开关厂制造), 2T-II 型多头细胞样品收集器(浙江绍兴卫星医疗设备制造有限公司)等; 标记配基 L-[3, 4-³H]-谷氨酸(美国杜邦公司生产, 比放射性 1920.3 GBq), 非标记配基 L-谷氨酸(华美公司产品), 0.05 mol/L Tris-HCl 溶液(pH7.4), 自配闪烁液等; 匀浆缓冲液(pH7.45~7.55), 梯度蔗糖液(70%、45%、41%及37%), 磷标准溶液, 10% 抗坏血酸, 钼酸铵试剂, 定磷溶液等。

1.3 脑突触膜的制备

术后3个月, 以图形视觉诱发电位技术检测视觉电生理功能发现异常, 确定单眼视觉剥夺弱视模型建立成功^[3]。两组动物氯胺酮肌肉注射行基础麻醉, 然后以20%乌拉坦腹腔注射麻醉动物, 首次剂量5 mL/kg(0.75~1.0 g/kg), 每小时维持量是原始总量的1/5。在深麻醉状态下将实验动物开颅, 暴露其大脑皮层。在平薛氏回和后薛氏回之间的外侧沟后端取材, 得到视皮层组织, 以生理盐水冲洗, 滤纸吸干, 准确称重后, 尽量剪碎组织, 以匀浆器制备匀浆。过滤匀浆液, 12100×g, 20 min 离心滤液。收集沉淀, 加缓冲液和70%蔗糖, 制备48%蔗糖浓度的样品液, 行蔗糖梯度超离心, 78000×g, 2 h。收集37%~41%蔗糖界面的膜成分, 稀释增容后27000×g 离心20 min。取少许沉淀, 以5'-核苷酸酶测定法行膜鉴定。证实其酶比活性较梯度离心的其它两层高时, 则收集沉淀并稀释至2 mL, 分装, 于-30℃低温贮存备用。上述所有操作均在冰浴中或4℃环境下进行。

1.4 放射性配体-受体结合实验

将突触膜悬液用0.05 mol/L Tris-HCl 溶液处理, 悬浮, 用于受体结合实验。反应体系总体积为0.5 mL。总结合管含0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液、0.04 mg 突触膜蛋白和10.00 nmol/L 标记谷氨酸100 μL, 非特异结合管加入0.02 mmol/L 非标记L-谷氨酸100 μL; 不足体积用缓冲液补足。混合均匀后, 放入25℃水浴振荡器结合30 min, 加入1 mL 冷缓冲液终止反应。立即用多头细胞收集器真空抽滤, 收集受体-配基复合物。用缓冲液洗去游离配基, 共洗5次。取出附有受体-配基复合物的玻璃纤维滤膜(49型, 上海摩速科学器材有限公司), 37℃

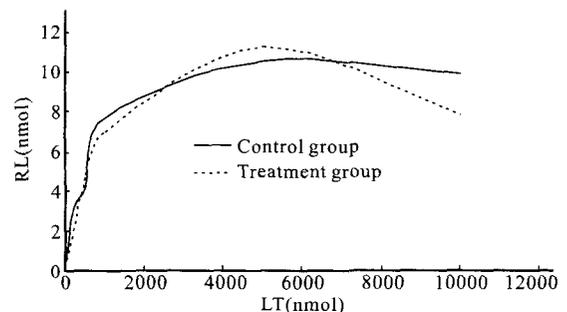
烘干后置闪烁瓶中, 加5 mL 闪烁液, 静置2~3 h 后进行闪烁计数, 测定其放射活性。仪器计数效率为14.35%。应用RBA分析软件(上海第二医科大学提供)进行数据处理, 得出视皮层GluRs结合位点数(RT)和亲和力(KD)值。

1.5 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用双侧t检验, $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

样本的质量作用(Mass Action)曲线见附图。对照组与处理组视皮层GluRs RT和KD值见附表。



附图 对照组和处理组的质量作用曲线

Fig The curve of Mass Action

LT: Total amount of ligand; RL: Amount of ligand-receptor compounds

附表 视皮层GluRs RT和KD值

Table The GluRs binding sites in the visual cortex(RT) and the value of KD

Group	n	RT(pmol/mg)	KD(nmol/L)
Control	6	137.35±9.21	559.58±26.57
Treatment	5	89.70±14.63*	880.37±72.80*

* $P < 0.001$, vs control group

结果显示, 幼猫经3个月单眼形觉剥夺后, 其视皮层GluRs结合位点数较对照组下降($P < 0.001$); 而KD值高于对照组($P < 0.001$), 提示处理组视皮层GluRs亲和力低于对照组。

无论对照组还是处理组, 放射性配体-受体结合实验的Hill系数均接近于1, 表明: 配体L-[3, 4-³H]-谷氨酸结合于单质受体, 为单纯双分子反应, 服从质量作用定律; 即使GluRs存在多个结合位点, 这些结合位点对L-[3, 4-³H]-谷氨酸的亲和力也相同, 不存在正、负协同效应。

3 讨论

长期以来, 临床上将弱视定义为单眼或双眼的

视力减退,且经睫状肌麻痹检影后矫正视力 ≤ 0.8 ,而眼科检查无器质性病变^[4]。就理论上而言,弱视既然是一种视功能的异常状态,那么必然有其发生的物质基础,只不过目前临床的检测手段不够灵敏,未能检测出这种异常。

近年来,人们利用应用药理学、免疫细胞化学以及分子生物学技术从中枢神经系统常见的一对抑制性和兴奋性神经递质—— γ -氨基丁酸(GABA)和Glu及其GluRs来探索弱视的发病机制。GABA能受体神经元的中介作用是外膝体行使功能的重要组成部分,但不同的研究者对单眼剥夺时GABA受体所表现出的效应的实验结果不尽一致,因此GABA能受体神经元是否在剥夺性弱视的发生、形成中起到直接的抑制作用尚需探讨。已经证明,Glu是视网膜到外膝体、外膝体到视皮层投射轴突末梢的主要兴奋性神经递质,与视路的兴奋性传导密切相关^[5]。其离子型受体——NMDA受体在猫依赖视觉经验的视皮层可塑性发育中起重要作用^[6-9]。因此,在探讨弱视发病机制时,不可忽视对GluRs的研究。

形态学与生理学的研究已经证实^[10-12],单眼剥夺的效应主要发生在视中枢。本研究利用高度特异和敏感的受体放射性配体结合分析方法研究了视皮层中与视觉兴奋性传导及视觉系统可塑性变化密切相关的突触膜受体——GluRs的状况,结果发现单眼剥夺猫视皮层GluRs的结合位点数较对照组明显减少,而受体亲和力较对照组也显著降低。

GluRs包括NMDA受体和非NMDA受体两种亚型。NMDA受体亚单位(R_1)在发育期猫视皮层表达情况的研究^[9]提示:在猫视皮层眼优势柱形成的关键期(生后34~53d), R_1 在视皮层IV层的表达瞬时升高达峰值;单眼剥夺2周后,接受剥夺眼输入的视皮层眼优势柱内 R_1 的表达明显下降。这与本实验所观察到的GluRs结合位点数在处理组动物视皮层下降的结果相一致。NMDA受体在生后早期的突触传递中起着巨大的作用,并参与外膝体到视皮层投射轴突的分离过程,对来自视网膜的视信号起转换作用^[13]。除此之外,NMDA受体的功能尚涉及其他方面^[14],如突触后膜的激动能力等。这意味着NMDA受体在视皮层的视觉发育和可塑性方面起着重要作用。受体结合位点数的减少及受体亲和力的下降必然使其功能受到影响,进而通过胞内第二信使系统,产生缓慢的生理效应。这是否就是剥夺性弱视发生的可能机

制呢?就本研究的结果来讲尚不能作出定论。因为我们检测的是GluRs,而未测定其亚型。另外,作为中枢抑制性递质的GABA,其受体在剥夺性弱视动物模型视皮层的状况如何以及是否作为抑制因素参与了弱视的发生等问题本研究均未涉及。再有,GluRs功能的变化如何具体地影响胞内第二信使系统,进而产生哪些相应的视觉生理效应亦尚未明确,均需进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 雷迅文,曾贵峰,李晓林.弱视的基础与临床的研究进展.眼科新进展,2008;10(4):318.
- 2 Wiesel TN, Hubel DH. Effects of visual deprivation on morphology and Physiology of cells in the cat's lateral geniculate body. *Neurophysiol*,1963;26(11):978-993.
- 3 刘铮,侯川,马麟.发育期单眼形觉剥夺视模型猫VEP特征的研究.眼科新进展,2009;29(4):250-253.
- 4 严密.眼科学.第4版.北京:人民卫生出版社,1995:176-177.
- 5 Montero VM. Quantitative immunogold analysis reveals high glutamate levels in synaptic terminals of retino-geniculate, cortico-geniculate, and geniculo-cortical axons in the cat. *Vis Neurosci*,1990;4(5):437-443.
- 6 邵立功,郭静秋.不同时限单眼斜视和剥夺猫视觉系统的神经生长因子表达研究.眼科,2000;9(3):181-185.
- 7 邵立功,郭静秋,李婷立.单眼斜视和剥夺猫视皮层17区N甲基-D-天冬氨酸受体1亚单位的表达.眼视光学杂志,2002;4(4):211-214.
- 8 Catanalo SM, Chang CK, Shatz CJ. Activity-dependent regulation of NMDAR1 immunoreactivity in the developing visual cortex. *Neurosci*,1997;17(21):8376-8390.
- 9 Gondon B, Kinch G, Kato N, *et al.* Development of MK-801, Kainate, AMPA, and Muscimol binding sites and the effect of dark rearing in rat visual cortex. *Comp Neurol*,1997;383(1):73-81.
- 10 周凤,邱良秀,刘春民.单眼剥夺大鼠视觉系统三级神经元Bcl2表达的研究.眼科研究,2005;23(1):26-29.
- 11 李宇,钱益勇,张振平等.蛋白激酶 α 和 β 在视觉剥夺性大鼠视皮层中表达变化的初步分析.解剖学研究,2002;24(2):141-145.
- 12 李宇,钱益勇,张振平等.cAMP反应元件结合蛋白(CREB)在单眼剥夺弱视大鼠视皮层中的表达研究.神经解剖学杂志,2004;20(3):245-250.
- 13 Fox K, Daw N, Sato H, *et al.* Dark-rearing delays the loss of NMDA-receptor function in kitten visual cortex. *Nature*,1991;350(6316):342-344.
- 14 Aoki C, Venkatesan C, Go CG, *et al.* Cellular and subcellular localization of NMDA-R1 subunit immunoreactivity in the visual cortex of adult and neonatal rats. *J Neurosci*,1994;14(9):5202-5222.

(2009-05-07收稿,2009-08-27修回)

编辑 余琳